

## 【内容説明】

### 背景

遺伝物質である DNA の標準構造は二重らせん構造である一方、四重らせんなどの特殊な構造も形成することができます(図 1)。四重らせん構造は複製反応を阻害し、遺伝情報にエラーを引き起こすため(図 2)、四重らせん構造とがんの因果関係が注目されています。四重らせん構造は、グアニン四重らせん構造 (G 四重らせん) と i-モチーフ構造があり、配列や環境の違いでトポロジー (らせんの巻き方) が変化します(※1)。しかし、このような四重らせんの構造の違いが複製反応に及ぼす影響については明らかになっていませんでした。

そこで研究グループは、DNA の各特殊構造の熱安定性と複製反応速度の相関性を定量解析し、特殊構造の違いで複製反応が阻害される仕組みを調べました。

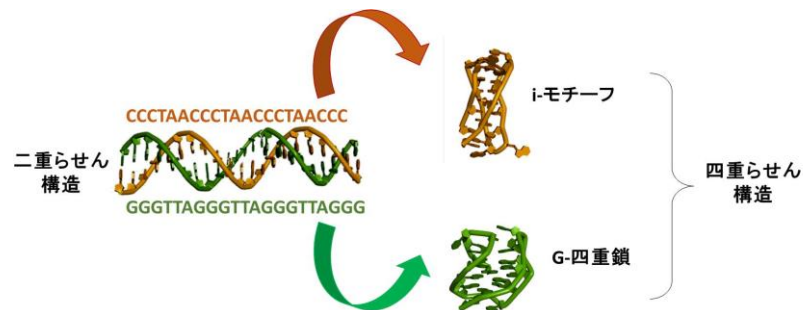


図1 DNA の標準構造と特殊構造

DNA にはアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)という 4 種類の塩基があり、A は T と、C は G と結合し(ワトソン・クリック塩基対を形成し)、二重らせん構造をつくる。さらに、G 及び C の連続配列から成る二重らせんはそれぞれの DNA 鎖が、G 四重らせんや i-モチーフとよばれる特殊な四重らせん構造もつくりすることができる。

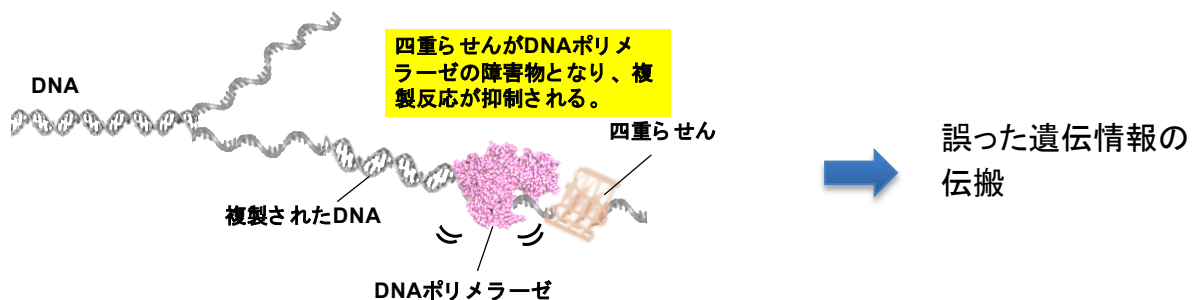


図 2 生体内での四重らせん構造の形成

複製中の DNA 鎖に四重らせん構造が形成されると、複製反応が阻害される。その結果、がん発生の原因となる遺伝情報のエラーが生じる。

### 研究手法と成果

弱酸性の溶液中で (※2)、Klenow Fragment DNA ポリメラーゼ (※3) によ

る DNA 複製反応をゲル電気泳動 (※4) で解析しました (図 3)。その結果、特殊構造を持たないランダム配列の複製反応では完全に複製された反応産物のみが観察されました (図 3A)。一方、ヒトのがん関連遺伝子であるテロメア由来ハイブリッド型 G 四重らせんと Hif1a 遺伝子由来の i-モチーフ構造の複製反応では、完全に複製された反応産物の他に、短い不完全な反応産物が観察されました (図 3B, C)。不完全な反応産物は、Klenow Fragment が鋳型 DNA 上の四重らせん構造を乗り越えられずに、複製が停止していることを示します。また、二重らせんからなるヘアピン構造では不完全な反応産物がほとんど観察されませんでした (図 3D)。

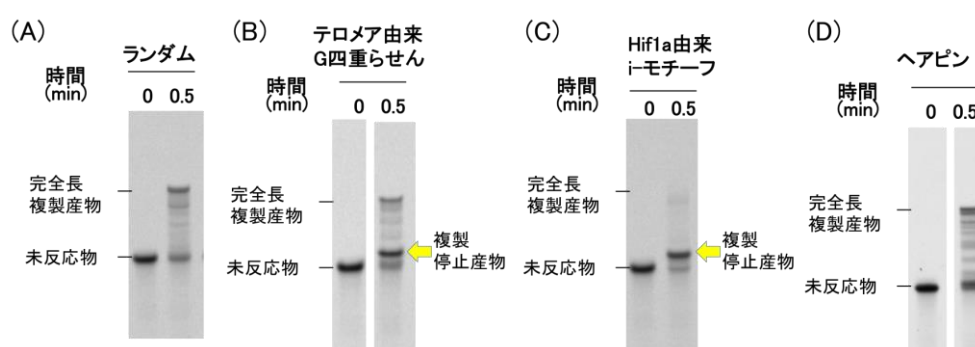


図 3 特殊 DNA 構造の複製反応のゲル電気泳動結果

(A)特殊構造を持たない DNA の複製、(B)ヒトテロメア由来の G 四重らせんを形成する DNA の複製、(C)Hif1a 配列由来の i-モチーフ構造を形成する DNA の複製、および(D)ヘアピン構造を形成する DNA の複製。四重らせん構造の影響で、複製が途中で停止した産物が観察される。

続いて、UV メルティング法 (※5) を用いて各特殊構造の熱安定性 ( $-\Delta G_{37}^{\circ}$ ) (※6) を算出し、Klenow Fragment が特殊構造を乗り越える複製速度を比較しました。その結果、熱安定性は同程度であったにもかかわらず、複製速度は i-モチーフ構造が最も遅く、続いてハイブリッド型 G 四重らせん構造、ヘアピン構造の順に速くなることが分かりました。つまり、特殊構造の違いによって複製反応の阻害効果が異なることが見出されました。

複製速度と熱安定性の相関性解析から (図 4)、活性化エネルギー (※7) の比として、i-モチーフ構造の複製は、ハイブリッド型 G 四重らせんの約 3 倍、ヘアピン構造の約 17 倍のエネルギー障壁がありました。一方、パラレル型およびアンチパラレル型 G 四重らせんに関しては i-モチーフ構造と同様の高い複製阻害効果を示したことから、複製反応はトポロジー (らせんの巻き方) の違いによっても影響を受けることが明らかになりました。これらの結果は、i-モチーフやパラレル型およびアンチパラレル型の G 四重らせんの形成が、複製反応を強く阻害することで、がんの発生を引き起こす可能性を示すものです。

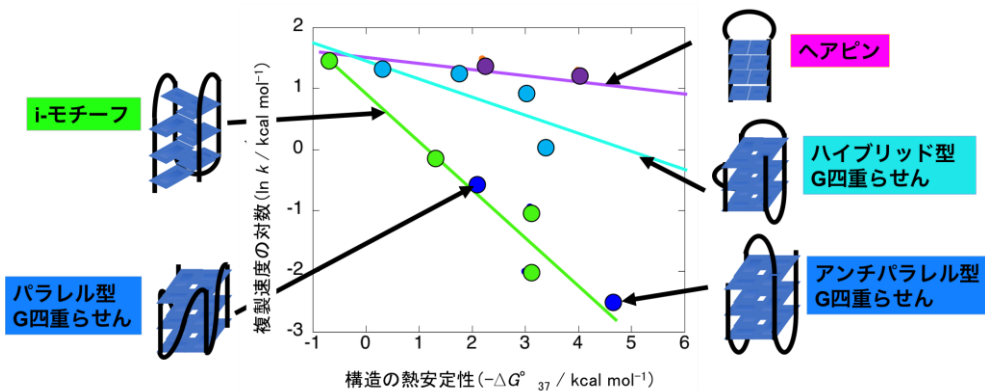


図4 特殊 DNA 構造の複製速度とその安定性の相関性解析

i-モチーフ（緑）、ハイブリッド型 G 四重らせん（水色）、ヘアピン構造（紫）のそれぞれのプロットを直線回帰した。傾きが大きいほど複製に必要なエネルギー障壁が高いことを示す。同じ G 四重らせんでも平行型やアンチ平行型（青）ではハイブリッド型より複製に必要なエネルギー障壁が高い。

このようなトポロジーは、溶液の環境によっても変化します。水溶性高分子であるポリエチレングリコール（PEG）（※8）を高濃度添加すると、i-モチーフや平行型四重らせんの構造形成が促進され、複製反応速度のさらなる低下が観察されました。これは、細胞内の環境変化で複製阻害効果が強まり、がんが発生するメカニズムを示唆する重要な結果です。

#### 展望・研究の波及効果

本研究から、四重らせんの形成や巻き方の変化によってがんが発生する可能性が明らかになりました。本研究で得られた知見を活用することで、四重らせん構造の形成を人為的に抑え、異常停止する DNA 複製反応を正常化できる技術の開発に貢献できると考えられます。今後、四重らせんの安定性や巻き方を変え、複製反応を制御できる化合物を探索・設計することで、がんの予防・治療ができる新薬の開発が期待できます（図5）。

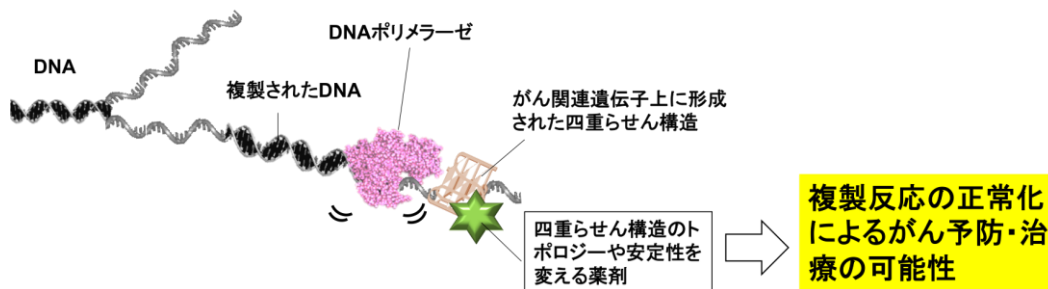
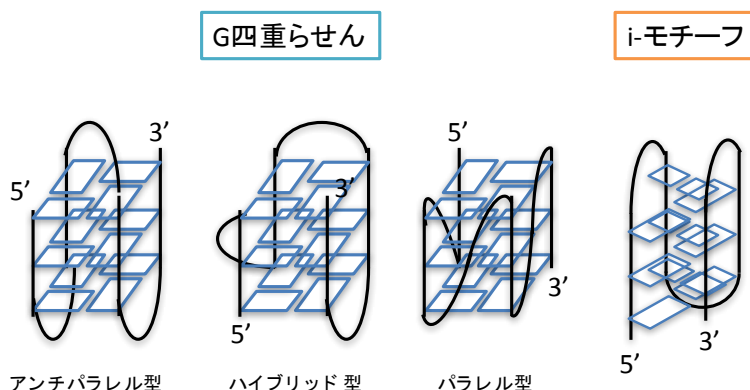


図5 四重らせん構造の制御による、がんの予防や治療が期待される。

## 【用語解説】

### 1、生体内での四重らせん構造の形成（※1）

四重らせん構造は様々なトポロジー（巻き方）を有する（下図参照）。G 四重らせんは四つの鎖が組み合う方向性でそれぞれアンチパラレル型、ハイブリッド型、パラレル型と分かれる。i-モチーフ構造は二つの二重鎖が互い違いに重なり合うことで四重らせん構造を形成する。



### 2、がん細胞模倣環境（※2）

がん細胞内は健康な細胞と比較して溶液が弱酸性になっており、本研究で用いた溶液の弱酸性条件はがん細胞環境を模倣したもの。

### 3、Klenow Fragment（※3）

大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I の複製反応を触媒する機能部位。DNA ポリメラーゼの基本構造は種を超えて広く保存されており、DNA ポリメラーゼのモデルとして用いられる。

### 4、ゲル電気泳動（※4）

ポリアクリルアミドなどのゲルを用いた DNA の分離技術。DNA は負電荷を帯びており、電圧を加えることで DNA はゲル中を陽極に向かって移動する。ゲルの網目構造により短い DNA ほど泳動距離が長くなる。

### 5、UV メルティング法（※5）

加熱や冷却によって分子構造が変化することで生じる分子の光吸収の変化を追跡する方法。DNA はらせん構造が解離すると 260 nm の吸収が増加する濃色効果を示す。四重らせんに関しては、構造が解離すると 295 nm の吸収が減少する淡色効果を示す。構造転移の温度依存性を解析して、構造の熱安定性を得ることができる。

## 6、熱安定性 (※6)

DNA 等の分子構造は形成と解離の平衡状態にあり、ちょうど構造形成および解離の状態が等しいときの温度を融解温度 ( $T_m$ ) とよぶ。また、ある温度においてその平衡の自発的方向性を示すエネルギー値を、自由エネルギー ( $\Delta G$ ) として定量的に示すことができる。本研究ではヒトの生体内反応が行われる、大気圧、37°Cでの自由エネルギー値 $\Delta G_{37}^{\circ}$ を熱安定性の指標として用いた。単位は1 mol 当たりの熱量として kcal mol<sup>-1</sup>を用いることが多い。

## 7、活性化自由エネルギー (※7)

反応が進行する際の遷移状態として定義される活性複合体を形成するために必要な自由エネルギー値のことを指す。

## 8、ポリエチレングリコール (※8)

エチレングリコールの重合体で、水溶性の高い高分子。細胞内の生体高分子の濃度は 400 g/L にもおよぶとされ、擬似的な細胞環境を再現するために用いられる高分子材料の一つ。